

図 18 各機関で菌株 no.1 を従来法と迅速法によって作成したプラグの泳動像の解析結果

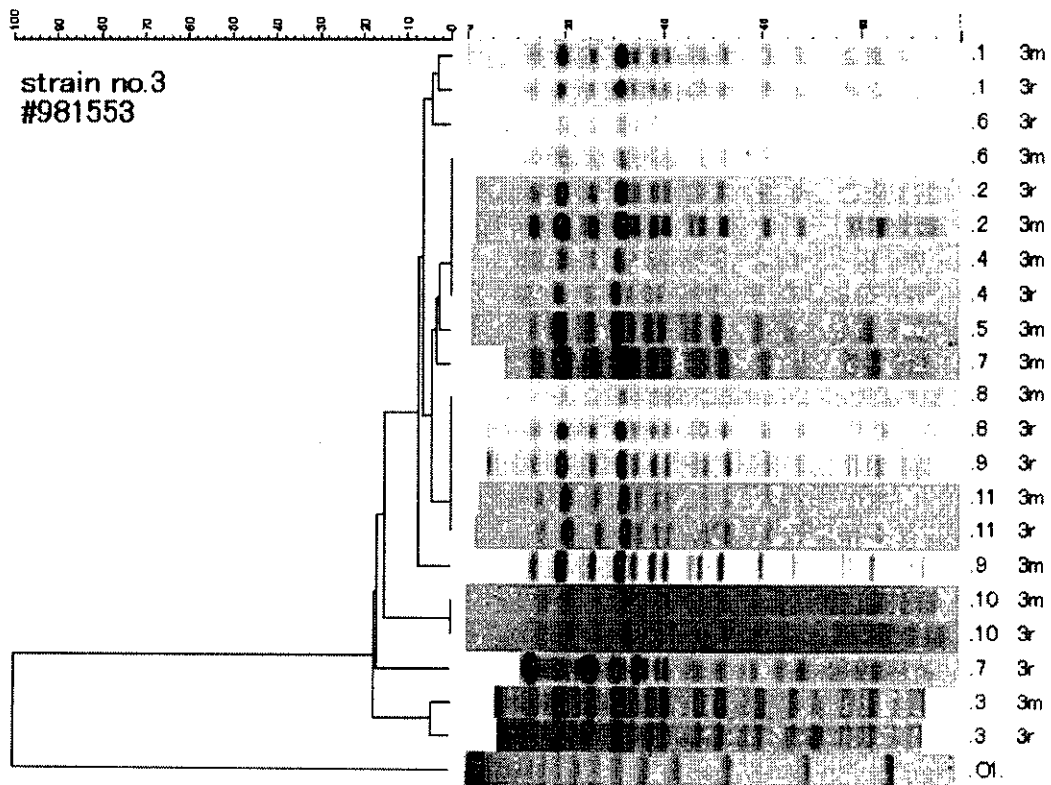


図 19 各機関で菌株 no.3 を従来法と迅速法によって作成したプラグの泳動像の解析結果

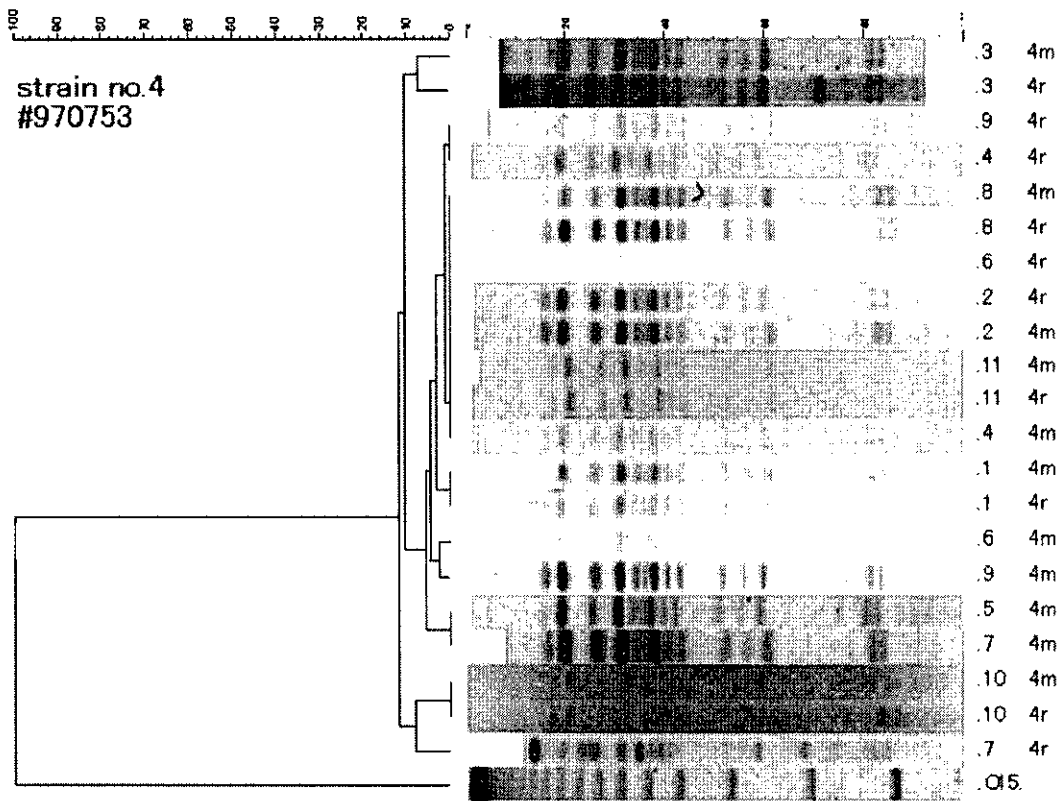


図 20 各機関で菌株 no.4 を従来法と迅速法によって作成したプラグの泳動像の解析結果

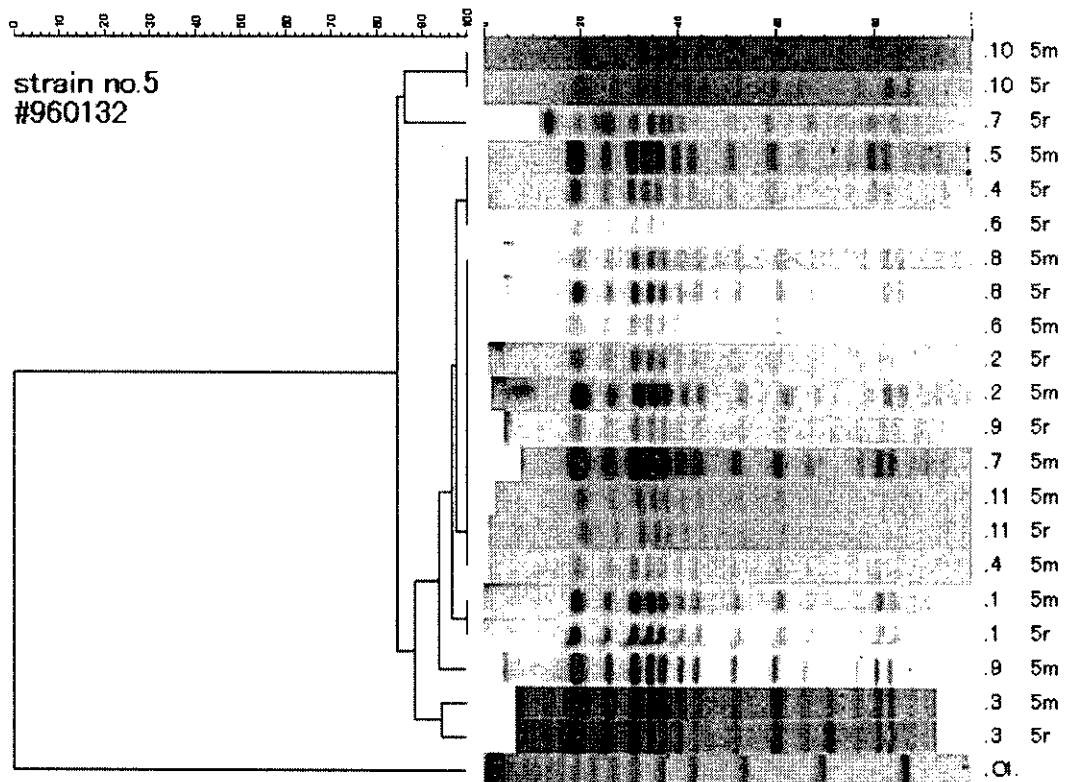


図 21 各機関で菌株 no.5 を従来法と迅速法によって作成したプラグの泳動像の解析結果

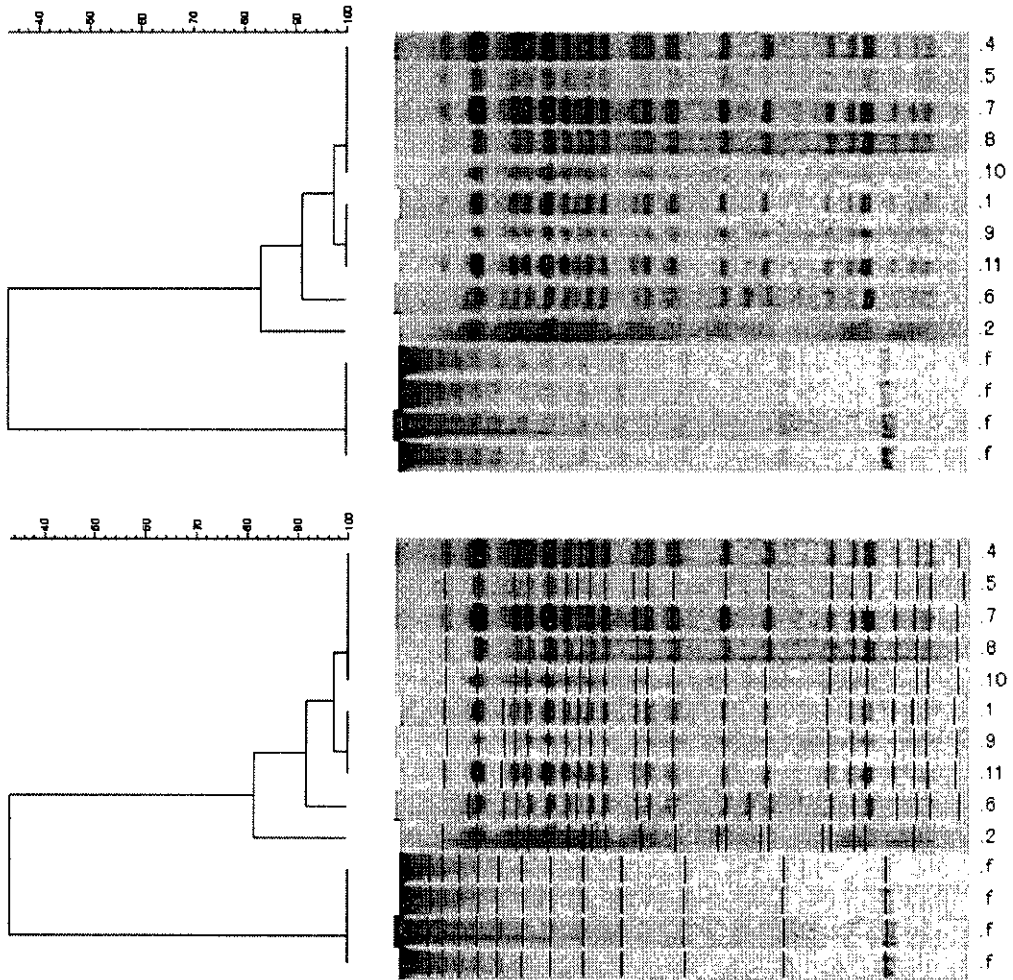


図 26 各機関で作成した菌株 no.2 のプラグを同時に泳動した画像の解析結果
(写真下は写真上の画像から自動認識されたバンドを示す)

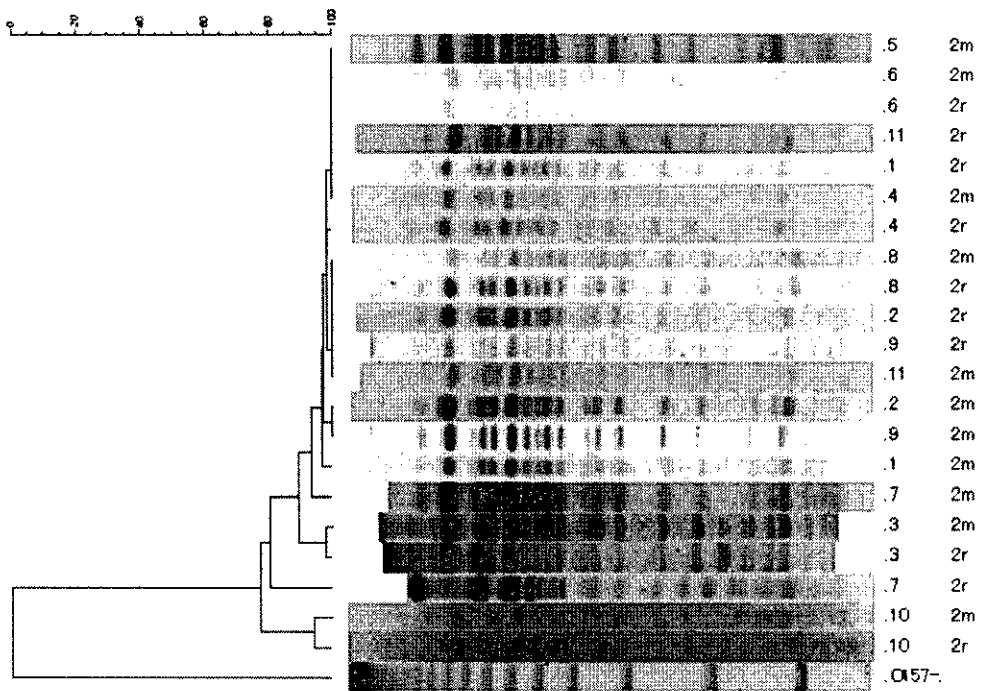


図 22 各機関で菌株 no.2 を従来法と迅速法で作成したプラグの泳動像の解析結果

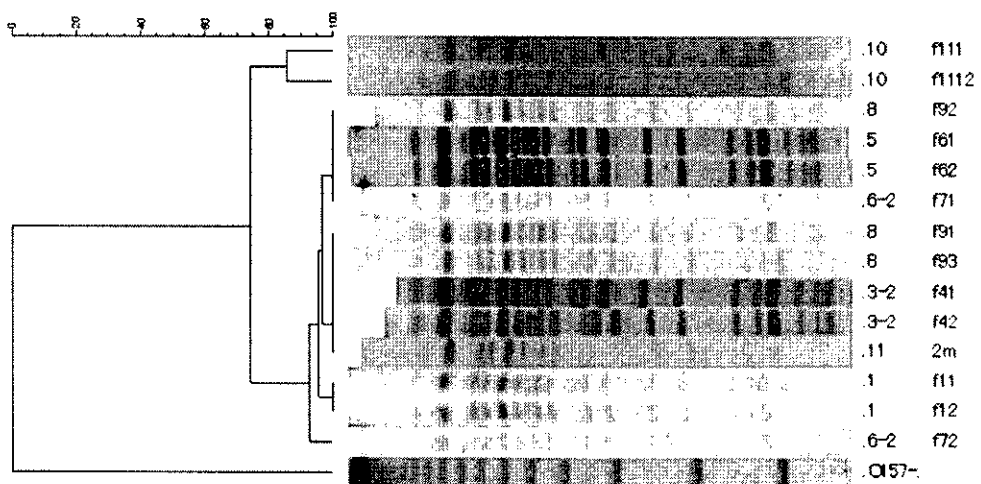


図 23 福岡県から配布した菌株 no.2 プラグを各地研で泳動像した DNA パターンの解析結果

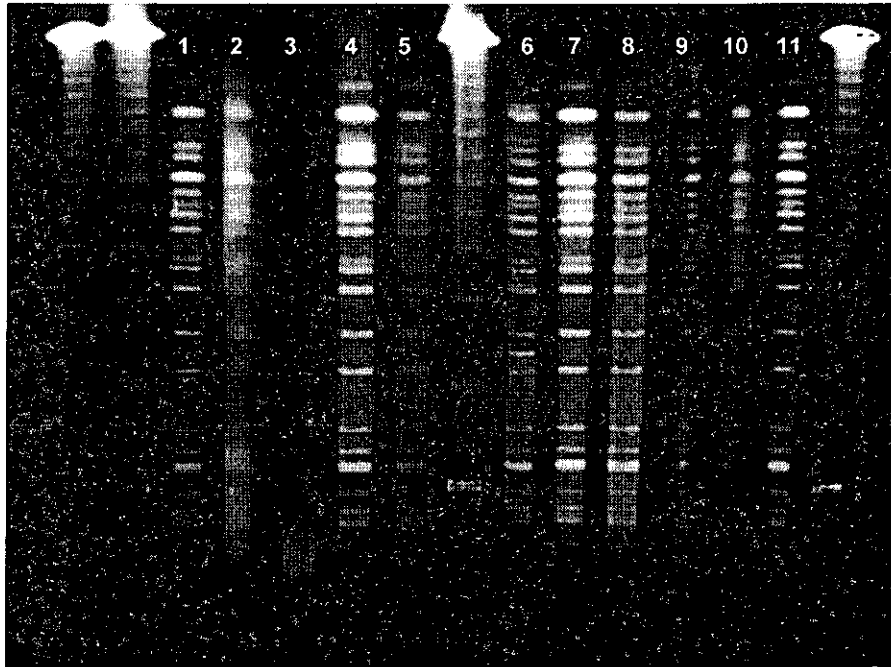


図 24 各機関から送付された菌株 no.2 プラグの同一ゲル泳動像

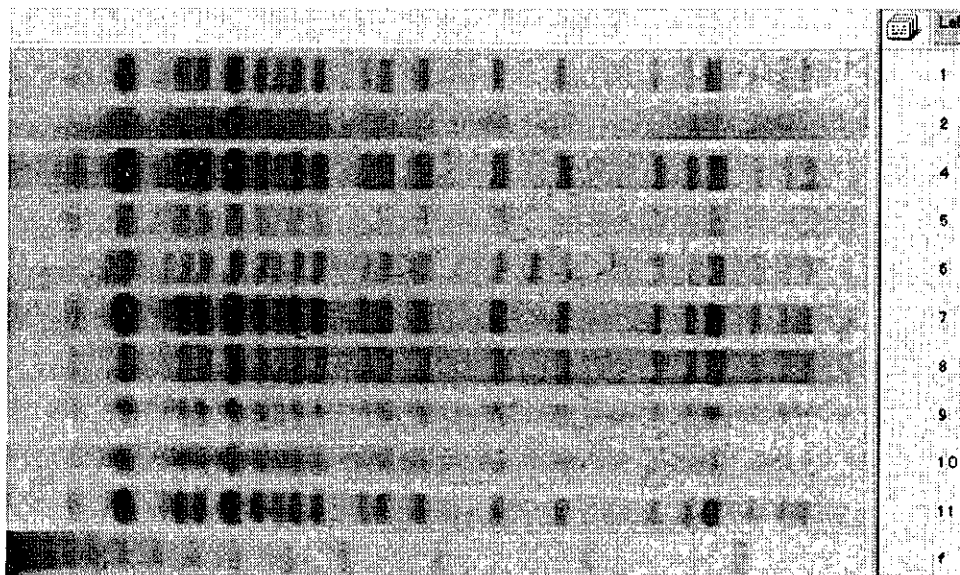


図 25 各機関から送付された菌株 no.2 プラグの同一ゲル泳動像

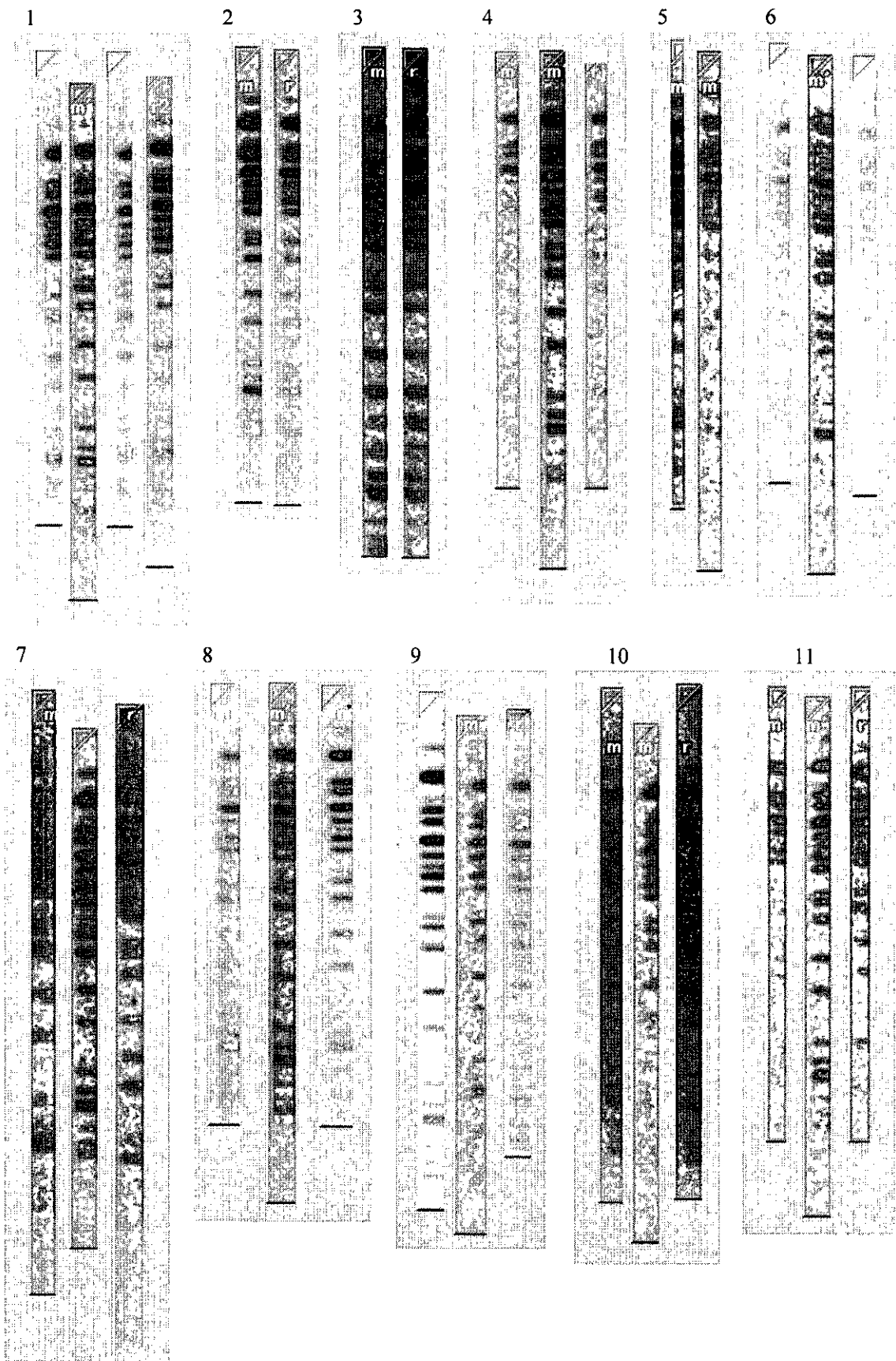


図 27 各機関での菌株 no.2 の泳動像

平成 12~14 年度総合研究報告書

パルスフィールド電気泳動法 (pulsed-field gel electrophoresis,PFGE) の標準化および画像診断を基盤とした分散型システムの有効性に関する研究

主任研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所細菌第一部長

3年間の研究班において PFGE 解析の標準化および精度管理を重点的に行い、パルスネットに向けての試行を行った。また、いわゆる”diffuse outbreak”の迅速なる検知、及びその解析に PFGE の威力が優れていることを多くの実例を用いて検証した。PFGE の標準化及びその制度管理においては、全国を6ブロック(北海道、関東、中部、近畿、四国、九州)に分けて、各ブロックの代表者を中心に精度管理が進められた。感染研で先に作製した標準的プロトコールの一部改良等が行われ、かなりの精度において安定した結果が得られるようになってきた。統一的プロトコールと定期的な精度管理のための Ring trial を継続すれば、決められた株の PFGE パターンに対する相似度をかなりの確率にもって高めていくことが可能であることが判明した。地味な活動であるが、このシステムを継続的に行うことによって、集団事件の発生の拡大を未然に防ぐことができ、国民の健康維持に貢献できるであろう。また、国際的なパルスネット構築の動きがある。世界的規模で起こるようになってきている集団事例の制御に貢献できるシステムであるので、我が国も積極的に支援していくことが必要である。

分担研究者：

矢野昭起(北海道立衛生研究所)
甲斐明美(東京都立衛生研究所)
田中大祐(富山県衛生研究所)
小林一寛(大阪府公衆衛生研究所)
田中博(愛媛県立衛生研究所)
堀川和美(福岡県保健環境研究所)
寺嶋淳(国感染症研究所)

A. 研究目的

腸管出血性大腸菌、サルモネラ、腸炎ピブリオ、赤痢等の腸管感染症(食中毒を含む)の大規模化あるいは、散在的集団発生(diffuse outbreak; 一見散発事例の多発にみえるが実は同じ原因で起こっている集団事例であるケース)の発生により被害が拡大した場合には、犠牲者の数が多大になる。被害の拡大を未然に防ぐためには、感染および汚染原因の迅速なる究明およびその除去が不可欠となる。そのためには、患者情報をもとにした食中毒・感染症情報とその情報を科学的に裏付けするための菌学的解析結果の2面からの判断

が重要となる。パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)により解析された菌学的情報システム(パルスネット)を取り込むことにより、感染症の集団発生および diffuse outbreak を迅速に検知し、その拡大を未然に防ぐ対応を図ることが必要である。そのためには、地方衛生研究所と国立感染症研究所間のネットワークの構築、及びそのネットワークの精度および信頼性を高めるための、PFGE 技術の精度管理(方法の標準化、技術の質の恒常化、解析方法の均一化、情報の還元方法の統一化等)とその維持が不可欠である。当研究に於いては、それを充実させることを目的とする。このネットワークが確立することにより、現在以上に菌学的解析結果の還元が迅速及び正確になり、腸管感染症の拡大防止に役立つことが期待できる。

B. 研究方法

3年間の事業において以下の点を重点的に行う。

①精度管理：PFGE のネットワーク化にとっ

で最も重要な点は、技術の均一化、およびその精度管理である。全国に74ある地方衛生研究所（地研）の技術的レベルが必ずしも一定レベルでないので、6つに分けたブロックでブロックごとに各種の菌について PFGE 解析を行い、その有効性、および精度管理を行う。②有効性の検証：新しく作成した解析ソフトをつかって PFGE 画像を処理することにより、お互いの菌の相同性を識別し、離れた場所あるいは離れた時間において分離された菌が同一汚染原因由来のものかどうかを判定する方法を開発する。さらにそのデータをインターネットを用いて感染研に電送するシステムの試行、及び送られた画像を解析した結果を還元する試行を行う。それにより各事例での有効性を検証する。

③国際的ネットワーク化の取り組み：世界的パルスネット化の動きへの積極的参加および対応。

C. 研究結果と考察

1. 感染研における研究

1. PFGE の標準化およびデータベースの作成

平成12年度の分担研究において PFGE の泳動条件の検討を行い、標準化した PFGE 条件でその後の解析を行った。平成13年に感染研に送付された EHEC の総数は3452株で平成13年に分離された EHEC O157 は2438株あった。さらに EHEC O157 2438株中 PFGE 解析結果で同一パターンと考えられる分離株が534株(21.9%)検出され、これらの株が分離された地域は北海道と東北地方の一部を除くほとんどの都府県が含まれていた。平成14年においても下記のように diffuse outbreak が発生した。まず、4月下旬から5月にかけて近畿地方6府県の焼肉チェーン店において diffuse outbreak が発生した。感染研のデータベースにはこれらの発生以前に同一の遺伝子型であると思われる O157 が平成13年12月末から14年1月初めの散発事例から分離されていたことを示す情報が存在した。2自治体からの送付株は同一遺伝子型であったが事例数が少なく疫学的な調査結果も不明で、両者の関連を即座に立証するには至らなかった。EHECO157 の遺伝子型に多様性が存在することが明らかになっているなかで、複数の地域から同一遺伝子型の菌株が分離された場合に関連性を疑うべきとする今までの経験を強く支持する結果と

なった。データベース構築にあたり菌株に付随する疫学的情報が極めて重要であることを示唆する事例であった。

EHEC 以外の菌種については、平成12年末から発生した輸入牡蠣関連の赤痢の事例において321株の赤痢菌について PFGE の解析を行い、輸入牡蠣から分離された赤痢菌の示す PFGE パターンと一致する分離株が日本各地の41自治体で分離されていることが明らかになった。2002年の5月以降に分離された *S. sonnei* の遺伝子型を調べる目的で、研究班6ブロックで分離された株の一部について韓国株との比較を行った。2001年末に分離されカキとの関連がある株や東南アジアからの帰国者から分離された株、韓国での流行株等が近似度95%以上のクラスターを形成したが、2002年後半に分離された株では、カキ関連株と同一遺伝子型を示す株は見つからなかった。したがって、少なくとも調べた株についてはカキ関連株とは異なる遺伝子型であり、2001年末からの同一遺伝子型の *S. sonnei* が一時的に広域から分離されていたことを支持する結果と考えられた。

2. 「PulseNet Japan」の構築と PFGE 解析結果の配信

各機関における PFGE 解析結果を直接入力してデータベースを構築してゆくことが目標であるが、正確なデータベースを構築するためには異なる機関における解析結果では精度が十分であるとは言えず、現実的には感染研での解析結果をデータベースとして構築している。このデータベースに基づき、発生する事例に対応するために、下記の方法による2本立てのネットワーク運営を行って来た。すなわち、広域での発生が疑われた事例等については、感染研で得られた結果(PFGEの画像)の一部について本研究班構成機関に Internet 経由で電送し、各地での PFGE 解析結果との比較のための参考資料とした。また、解析結果をほぼ1ヶ月おきに WISH 上の個別システムである「PulseNet Japan」で公開し、疫学調査等のための還元資料とした。このシステムの問題点として、下記の諸点についての改善が将来的には必要であると考えられたが、現実的には同時に記した対応策も可能であろう。

A) 同一施設内における実験結果で実際には100%一致すべきところが、解析ソフトを利用した結果(デンドログラム)では、近似度100%にならない場合があり、解

析ソフト利用における限界であると考えられた。泳動像の目視による評価（画像）とデンドログラムによる結果の食い違いが生ずる恐れがある。Internet 経由のデータの還元では、デンドログラムと同時に画像情報も送信し、両方を用いて判定することが重要であろう。

- B) PFGE 解析結果とともに公開している疫学情報等のセキュリティを高めるために、関係機関内の閉鎖ネットワークである WISH を利用しているが、コンピュータ端末の数が少ないなど情報を入手する際の利用の面においてやや問題があると考えられた。アクセスの容易さからも、Internet 利用による情報の公開の可能性についても検討すべきであると考えられる。個人のプライバシーに抵触する情報は無いことを考えると、ID やパスワードの設定によってセキュリティを確保して感染研のホームページ上に公開するのも一つの手段かもしれない。

3. 世界も結ぶ「パルスネット」の構築

現在、パルスネットを世界的に結ぶ案が CDC を中心に出されている。2002 年 12 月にハワイで第 1 回目の会議が開かれ、アジア 10 カ国の代表（日本も含む）、米国、EU、カナダ、オーストラリア等が集まり、前向きの方で取り組むことで合意した。今後、PFGE の方法の統一（同一プロトコルの使用）、優先的にとりくむ菌株の選定等の話し合いの元に、ネットワーク化を進める方向で行うこととなった。

2. 各ブロックにおける研究成果

(I) 北海道・東北・新潟ブロック

北海道・東北・新潟ブロックの地方衛生研究所の共同研究で、腸管出血性大腸菌 EHEC O157 等による集団あるいは散発事例について、パルスフィールド電気泳動（PFGE）を用いた菌学情報システム（パルスネット）へ結合するための基礎的研究を実施した。平成 12 年度は、同ブロック内の 7 衛生研究所で O157 菌による感染事例について PFGE の応用事例を検討し、PFGE の有用性を明らかにした。すなわち、家族内感染や集団感染事例などの疫学的に関連性のある事例では、分離株の PFGE パターンは完全に一致しているかお互いに非常によく似たパターンを示した。一方、散発事例由来株では、その PFGE パターンは独立したパターンを示した。平成 13

年度には、西日本においてカキの喫食を原因とするソルネ赤痢菌による感染事例が多発し、パルスネットを通じていち早く各地方衛生研究所に該菌の PFGE 画像が配信された。これにより、西日本流行株と地方で分離された菌株との迅速な比較が可能となり、本ネットワークの有用性が示された。一方、O157 菌については、同ブロック内の 7 衛生研究所で実施した PFGE の画像について DNA 解析用ソフトであるゲルコンパーII を用いたクラスター解析を行い、同ブロック内における O157 菌の遺伝子型について調べた。その結果、各地研での PFGE パターンは適度に分散せず、各地研毎にクラスターを形成する傾向が認められ、手技や泳動条件における標準化の必要性が示唆された。そこで、平成 14 年度には同ブロックの 10 衛生研究所に対して PFGE に関する 2 回の精度管理を実施した。1 回目には、PFGE と同時に方法に関するアンケート調査も実施し、統一したマニュアルを作成するための資料とした。PFGE の解析結果では、泳動条件の相違などによって施設間の similarity はそれほど高くはなかった。このことを踏まえ、2 回目は試行マニュアルを作成しこれに沿って PFGE を実施したところ、施設間較差は改善されおおむね 70%以上の similarity が得られるようになった。一方、北海道において分離された 22 株の特異な表現形質（β-グルクロニダーゼ産生能）を示す腸管出血性大腸菌 O157:H7 について PFGE による DNA 解析を行ったところ、これらの 22 株は互いに非常によく似たパターンを示し、独立したクローンに属することが示された。このように、PFGE は感染源調査あるいは感染事例の疫学調査において有用な手段であることが示され、PFGE の精度維持のためには定期的な精度管理あるいは技術研修等が必要である。

(II) 関東・甲・信・静岡ブロック

各研究所は、いずれも実際に発生した集団および散発の感染症・食中毒事例について、独自に PFGE 法による解析を実施し、非常に有効であった事例を多数確認した。それに伴い、解析技術も進歩し、パルスネット構築のための環境整備が図られてきたことが明らかとなった。

また、PFGE 画像を電送することにより、研究所間での菌株の比較がある程度可能となった。この方法は簡単であり、感染源調査の

方向性を早期に決定する上で非常に有用であることが確認された。

腸管出血性大腸菌O157の共通菌株を各研究所ではほぼ同一の条件下でPFGE解析を行い、その成績を都立衛生研究所に電送して画像解析ソフトを用いて解析を試みた結果、都立衛生研究所に電送された画像写真は、一定の精度を持っていることを確認した。さらに、その画像写真を用いて解析ソフトによる解析を行った結果、一部に技術的問題点も認められた。特にPFGE画像について解析ソフトを用いて解析する場合、鮮明でシャープなバンドが解析に必要である。そのための解決策として、最近開発された薄いコーム(0.7mm)を使って泳動することの検討が示唆された。また、小さいサイズのバンドは、解析ソフトで読み取るのが非常に困難な場合が多いので、100kb以上のバンドを対象とする方法も検討する必要がある。

(III)東海・北陸ブロック

Diffuse outbreak(散在的集団発生)を早期に検出するパルスネットがO157のみならずO26にも応用可能か否かを検討するために以下の研究を行なった。

東海・北陸地方で平成8年から12年に検出された196株のO26を用いたPFGE解析結果から、O157のPFGE泳動条件は、十分な解析力を有してO26を型別分類することが可能であり、O26のPFGE泳動条件としても応用可能であることが明らかとなった。

解析ソフトを用いた結果から、105株(196株の代表株)のO26は71の異なったPFGE型に型別分類された。このうちの52の型(73.2%)は1PFGE型1株のみであった。一方、1PFGE型に2つから6つのO26が認められた型は19(26.8%)であった。これらの結果から、O26は遺伝子レベルで多様性を有しており、PFGEはO26の分子疫学的解析の有用な手段であることが示唆された。また、複数のO26が認められた19のPFGE型のうち3つは同一年に複数県の散発もしくは集団事例から検出されていたことからdiffuse outbreakの可能性も示唆された。

パルスネットの予備試験として愛知県で検出された4株のO26(2株は同一株)について愛知県、岐阜県、石川県、及び富山県の各地研でPFGEを実施し、その画像をメールで愛知衛研に電送した。愛知衛研では得

られた画像について解析ソフトを用いて解析を行なった。その結果、同一検体についてその相同性を地研ごとに比較したところ、その相同性は最も高い検体で78%、最も低い検体では僅か16%であり、現行では異なった地研が行なったPFGE画像を比較することを基本とするパルスネットの実施が容易でないことが示された。そこでPFGE画質に影響を与える要因について検討をおこなったところ、PFGE機種の一貫、ブロック作成の際の適切な菌液濃度(1ブロック当たり約 5.0×10^7)、及び約0.7mmのブロックのゲルへの挿入によってPFGE画質が改善されることが明らかとなった。

これらの結果から、O26はO157と同様遺伝子レベルで多様性を有しており、適切なPFGE実施条件の一貫を行なえば、O157と同一のPFGE実施条件を用いてパルスネットに応用可能であると思われる。よって本システムはO26によるdiffuse outbreakに対しても早期の発見及び拡大防止に威力を発揮することが期待される。

(IV)近畿ブロック

パルスネットジャパン構築の基礎的研究として、近畿支部11カ所の衛生研究所間で同一菌株と同一ゲルブロックを用いてPFGE型別を行い、本法の問題点とその解決策について共同で検討した。また集団発生や散発事例の疫学解析にPFGEを適用し有用性を検討した。

PFGE解析は、同じ集団間の患者由来株の類似性をみるには適した方法と考えられた。また地理的に離れた地域、お互いに交流のない家族内発生事例が頻発するような、平常時と異なった患者発生がみられた場合に、それらの菌株についてPFGE解析で菌株の類似性が確認されたならば、潜在的に流行が起きている可能性を考えた対策が必要であり、積極的に疫学調査を行う必要がある。そのためには広域で分離された同種菌株を迅速に比較することが必要で、パルスネットジャパンの構築が緊急課題である。しかし現状は各施設の画像の質が鮮明なものに統一されておらず異なる施設間の比較が困難であることから、PFGE解析法の標準化を図り、精度管理を徹底し、施設間格差を解消する必要があると考えられた。

(V)中国・四国ブロック

PFGE による DNA 解析は食中毒をはじめとする細菌性感染症の疫学調査に広く用いられている。また、この PFGE によって解析された情報のネットワークであるパルスネットの構築が感染研を中心に進められている。一方、最近の食中毒として、多府県にまたがった大規模な事例や患者が長期的かつ散発的に発生する事例が見られている。特に、行政単位を越えて患者が散発的に発生する diffuse outbreak の多くは疫学調査を詳細に行うことができにくいため、感染源、感染経路を特定することは難しい。今回、中・四国地区に発生し、本研究にも記述したイカ菓子や氷菓によるサルモネラ食中毒事例では PFGE 解析を行うことにより、同一の感染源であることが示唆され、喫食調査の結果を裏付けることができた。特に高知県と愛媛県にまたがって発生し氷菓を原因とするサルモネラ食中毒事例では、PFGE を行い、その情報を 2 施設間で交換することで、起因菌の特定、原因食品の特定、潜在的食中毒患者の検出、感染源の推察など発生の実態をより詳細に把握することができた。しかし、各施設の PFGE 解析技術は一律ではなく、PFGE 画像の一部には不明瞭なバンドやマーカの乱れなどが認められた。また、特定の PFGE 型とされた菌株画像の類似度も施設間で差異が生じた。これらは技術的な問題に起因するものと推察されるが、パルスネットを構築し、円滑に運用するためには、施設間の技術的信頼性を高めるとともに解析者のトレーニング等も含めた PFGE 解析技術の標準化と、それに伴う精度管理の必要があると考える。

(VI) 九州ブロック

現在、EHEC に関してすべて感染研において PFGE 型別が実施されている。一方では各機関においても EHEC を含めた種々の菌種について集団・散発事例の菌株について比較し、その関連性について解析を行っている。しかし、機関相互のデータを交換し相互の関連性を比較するいわゆるパルスネットには至っていない。そこで本研究ではパルスネット構築のため九州地区 12 地研の PFGE の解析及び各機関での PFGE 周辺状況を調査した。さらに解析ソフト GelComper II を用い一機関での画像解析を試みた。平成 12 年度では機器や PFGE 条件や方法に関する問題点がクローズアップされた。さらに、GelComper II の適正な使用には、かなりト

レーニングが必要であることも分かった。これら問題点の解決には、パルスネットを実施するために必要な最低機器の提示及び整備、PFGE 実施方法の詳細なマニュアル化及び研修、統一ゲル及び菌株を使用した PFGE の精度管理が必要である。

平成 13 年度は、12 年度の問題点を解決するため PFGE 実施方法の詳細なマニュアル化、統一菌株及び各機関分離株を使用した PFGE 像の比較を行った。その結果、平成 12 年度と平成 13 年度の精度管理の結果を比べると明らかに統一マニュアルの作成の成果が現れていると考えられた。一方、現時点で九州地区参加機関でのパルスネット実行には、PFGE および画像データ転送・ダウンロードにおける改善並びに整備が必要であることが分かった。PFGE では、①泳動槽の電流の点検、②チラー槽の点検、③イルミネーター上部ガラスの清浄点検、④イルミネーターの照度の確認、⑤写真撮影装置の点検、⑥PFGE 泳動用ゲル作成と充填時の注意、⑦制限酵素処理における注意等が今後の課題である。また、画像データ送信・ダウンロードをスムーズに実行するためには、予めネットワーク機関間でのコンピュータハードおよびソフト画面の調整並びに画像作成におけるマニュアルが必要であることが分かった。本研究ではホスト（画像データをダウンロードする側）が Macintosh で各ブランチ（画像データを送付する側）が Windows であったため、支障が多かった。しかし、対応するソフトを準備すれば問題解決は可能であったが、実用的でないと考えられた。特に解析ソフト GelComper II は、Windows 対応版であり、Windows で統一した方が現実的である。また、画像データの保存方法は、解析ソフト GelComper II の使用どおり「グレースケール、8ビット、TIFF 形式、画像サイズ 300-800kb 程度」と明記する必要があることが判明した。

平成 14 年度は、13 年度に判明した機関間でのインターネット環境調査を行った。また、画像を受け取るコンピュータを Windows にし、さらに大容量の画像をダウンロードできる環境を作った。また、画像の保存形式を徹底したことによって、画像授受における問題は発生しなかった。一方、5 種の菌株を 3 年間使用し各機関で作成・泳動した PFGE 画像による DNA 解析の結果、当初はプラグの作成上の問題点も多々あったが、統一マニュアルを作成することによって解決した。しか

し、なお同一菌株が 100%一致しない問題を
解明するため、「同一機関で作成したプラグ
を各機関で泳動すること」「各機関で作成し
たプラグを一機関で同時に泳動すること」を
試みた。その結果、改めてプラグの作成には
全く問題点が無く、λ-ラダー・泳動・写真
に問題があることが判明した。

D. 結論

①PFGE 解析は diffuse outbreak の迅速なる
検知および集団事件の科学的証拠の提示に
不可欠な手法であることを多くの事例で示し
た

②PFGE 解析の精度を上げるためには、技術
の標準化、普段からの精度管理、その研修が
重要である。

③世界的な PFGE 解析ネットワーク（パルス
ネット）に向けての国際的協力がなされ始
めている。我が国も積極的に取り組んでいく
ことが重要である。

E.3 年間の発表業績（本研究班員は下線
が引いてある。文献が挙げられていない
ブロック分は省いてある）

1. 英文原著

1) Arakawa,E., T.Murase, M. Matsushita,
T. Shimada, S. Yamai, T. Ito, and H.
Watanabe. Pulsed-Field Gel
Electrophoresis-Based Molecular
Comparison of *Vibrio cholerae* O1 Isolates
between Domestic and Imported Cases in
Japan in 1997. J. Clin. Microbiol.
38:424-426. 2000

2) Chida T, Okamura,N. Ohtani ,K.
Yoshida,Y, Arakawa,E. and Watanabe,H.
The complete DNA sequence of the O
antigen gene region of *Plesiomonas*
shigelloides srotype O17 which is
identical to *Shigella sonnei* Form I antigen.
Microbiol Immunol. 44 : 161-172.2000

3) Osawa,R., Wada,A., Iyoda,S., Yamai,S.,
and Watanabe,H. Variation of shiga
toxin-converting phages from
enterohemorrhagic *Escherichia coli*
O157:H7 isolates in Japan. J. Medical
Microbiol. 49:565-574. 2000

4) Sameshima,T., Akiba,M., Izumiya,H.,
Terajima,J., Tamura,K., Watanabe,H., and
Nakazawa,M. *Salmonella* Typhimurium

DT104 from livestock in Japan.
Jpn.J.Infect.Dis. 53:15-16. 2000

5) Terajima,J., Izumiya, H., Wada, A.,
Tamura, K. and Watanabe, H. Molecular
epidemiological investigation of
enterohemorrhagic *Escherichia coli*
isolates in Japan. J. Appl. Microbiology.
88: 99S-105S. 2000

6) Numata,N., Ushimizu,M., Ohtomo,M.,
Chida,K., Fujita, H., Saito,T., Suto,D.,
Oguro,M., Hayakawa,Y., Sasaki,K.,
Arakawa,E., Shimada,T., and
Watanabe,H. The use of colony
hybridization in the isolation of
thermostable direct hemolysin-producing
Vibrio parahaemolyticus from foods
implicated in an incidence of food
poisoning. Jpn. J. Infect. Dis. 53:75-
77.2000

7) Kai,E., Ikebukuro,K., Hoshino,S.,
Watanabe, H., and Karube,I. Detection of
PCR products of *Escherichia coli* O157:H7
in human stool samples using surface
plasmon resonance. FEMS Immunol.
Medical Microbiol.29:283-288. 2000

8) Iyoda,S., Tamura,K., Itoh,K., Izumiya,H.,
Terajima,J. and Watanabe,H. Inducible
stx2-phages are lysogenized in the
enteroaggregative and other phenotypic
Escherichia coli O86:HNM isolated from
patients FEMS Microbiol. Lett. 191 : 7-10.
2000

9) Yokoyama,K., Horii,T., Yamashino,T.,
Hashikawa,S., Barua,S., Hasegawa,T.,
Watanabe,H., and Ohta,M. Production of
Shiga toxin by *Escherichia coli* measured
with reference to the membrane vesicle-
associated toxins. FEMS Microbiol.Lett.
192:139-144.2000

10) Shindo,N., Osaka,K., Tanuguchi,K.,
Inouye,S., Terajima,J., Izumiya,H.,
Tamura,K., and Watanabe,H. Geographic
information system for food-borne
diseases in Japan: development of Food-
Info Net.. geography and medicine.
Geomed'99. A. Flahault,et. Al., eds.
Elsevier SAS.p. 97-101.2000.

11) Yuko Meno, Shuji Fujimoto, Kazumi
Horikawa, and Yoshida Shin-ichi, Release
of membrane vesicles containing

- endotoxic lipopolysaccharide in *Escherichia coli* O157:H7 clinical isolates, *Microbiological and Immunology*.44(4), 271-274. 2000.
- 12) Fujimoto Shuji, Kenichi Umene, Mitsumasa Saito, Kazumi Horikawa and Martin J. Blaser, Restriction fragment length polymorphism analysis using random chromosomal gene probes for epidemiological analysis of *Campylobacter jejuni* infections, *Journal of Clinical Microbiology*. 38(4), 1664-1667.2000.
- 13) Bin Chang, Shin-ichi Yoshida, Hiroshi Miyamoto, Midori Ogawa, Kazumi Horikawa, Kikuyo Ogata, Mitsuaki Nishibuchi, Hatsumi Taniguchi , A unique and common restriction fragment pattern of the nucleotide sequences homologous to the genome of Vf33, a filamentous bacteriophage, in pandemic strains of *Vibrio parahaemolyticus*, *FEMS Microbiol. Letters*. 192, 231-236. 2000.
- 14) Sunao Iyoda , Tomokazu Kamidoi , Kenji Hirose , Kazuhiro Kutsukake , and Haruo Watanabe. A flagellar gene *fliZ* regulates the expression of invasion genes and virulence phenotype in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbial Pathogenesis*. 30:81-90. 2001
- 15) Hirose,k., Tamura,K., Sagara,H., and Watanabe,H. Antibiotic susceptibility of *Salmonella enterica* serovar Typhi and *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A isolated from clinical patients in Japan. *Antimicrob.Agents.Chemother.* 45:956-958. 2001
- 16) Licheug Zhao, T. Ezaki, Z-Y. Li, Y. Kawamura, K, Hirose, and H. Watanabe. Vi-suppressed wild type strain *Salmonella typhi* cultured in high osmolarity is hyperinvasive toward epithelial cells and destructive of Peyer 's patches. *Microbiol. Immunol.* 45: 149-158.2001
- 17) Watanabe,H.,J. Terajima, H. Izumiya ,S. Iyoda , R. Osawa and K. Tamura . Molecular epidemiological investigation and genotypic diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* . Verocytotoxic *Escherichia coli*. *Epidemiology(Concerted Action CT98-3935)*. Vol.5. p.38-43. 2001.
- 18) Izumiya,H., Terajima,j., Matsushita,S., Tamura,k., and Watanabe.H. Characterization of multidrug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated in Japan. *J. Clinic. Microbiol.* 39: 2700-2703. 2001
- 19) Matsune,W., Ishikawa,k., Hayashi,K., Tsuji,M., Izumiya,H., and Watanabe.H. Molecular analysis of *Salmonella* Enteritidis resistance to ampicillin and streptomycin from three outbreaks of food poisoning in Shiga prefecture. *Jpn.J.Infect.Dis.* 54:111-113.2001.
- 20) Kazumi Horikawa, Koichi Murakami and Fujiko Kawano, Isolation and characterization of methicillin Staphylococcus aureus strains from nurses and their gowns, *Microbiological Research*.155, 345-349. 2001.
- 21) Terajima, J., Izumiya, H., Iyoda, S., Tamura, K., Watanabe, H. High genomic diversity of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* isolates in Japan and its applicability for the detection of diffuse outbreak. *Jpn. J. Infect.* 55, 19-22, 2002.
- 22) Iguchi, A., Osawa, R., Kawano, J., Shimizu, A., Terajima, J., and Watanabe, H. Effects of lysogeny of Shiga toxin 2-encoding bacteriophages on pulsed-field gel electrophoresis fragment pattern of *Escherichia coli* K-12. *Current Microbiology*, 46(3):224-7, 2003.
- 23) Ohnishi, M., Terajima, J., Kurokawa, K., Nakayama, K., Murata, T., Tamura, K., Ogura, Y., Watanabe, H., and Hayashi, T. Genomic diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 revealed by whole genome PCR scanning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99(26): 17043_17048, 2002.
- 24) Iguchi, A., Osawa, R., Kawano, J., Shimizu, A., Terajima, J., and Watanabe, H. Effects of repeated subculturing and prolonged room temperature storage of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 on pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* 40(8): 3079-3081, 2002.

- 25) Yamaguchi T., Yokota Y., Terajima J., Hayashi T., Aepfelbacher M., Ohara M., Komatsuzawa H., Watanabe H., Sugai M. Clonal association of *Staphylococcus aureus* causing bullous impetigo and the emergence of new methicillin-resistant clonal groups in Kansai district in Japan. *Journal of Infectious Diseases*, 185, 1511-6, 2002.
- 26) Nagano,H., Okui,T., Fujiwara,O., Uchiyama,Y., Tamate,N., Kumada,H., Morimoto,Y., Yano,S. Clonal structure of shiga toxin (Stx)-producing and β -D-glucuronidase-positive *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from outbreaks and sporadic cases in Hokkaido, Japan. *J. Med. Microbiol.* 2002. 51:405-416.
- 27) Osawa,R., Iguchi,A., Arakawa,E., And Watanabe,H. Genotyping of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 still open to question. *J. Clinical. Microbiol.* 40 : 2708-2709. 2002
- 28) Watanabe,H., Terajima,J., Izumiya,H., and Iyoda,S. Molecular typing methods for STEC; *Methods in Molecular Medicine*. Vol.73: *E. coli* Shiga toxin methods and protocols. Edited by; D. Philpott and F. Ebel. Humana Press Inc., Totowa, NJ. P.55-65. 2002
- 29) Tanaka *et al* : Molecular epidemiology of group A streptococci T serotype 1. *Jpn J Infect Dis* 55 : 89-90, 2002.
- 30) Matsumoto *et al* : Epidemiological investigation of a fatal case of cholera in Japan by phenotypic techniques and pulsed-field gel electrophoresis. *J Med Microbiol* 51 : 264-268, 2002.
- 31) Nakaya,H., Yasuhara,A., Yoshimura, K., Oshihoi,Y., Izumiya,H., Watanabe,H. Life-threatening infantile diarrhea from fluoroquinolone -resistant *Salmonella enterica* Typhimurium with mutations in both *gyrA* and *parC*. *Emerg. Infect. Dis.* 9:255-257. 2003.
2. 和文誌上发表
- 1) 伊豫田淳, 寺嶋淳, 和田昭仁, 泉谷秀昌, 田村和満, 渡辺治雄. 腸管出血性大腸菌の分子疫学. *日本細菌学雑誌*. 55 : 29-36.2000
- 2) 渡辺治雄. 我が国の食中毒の動向. *治療学*. 34 : 5-9. 2000
- 3) 泉谷秀昌, 田村和満, 渡辺治雄. サルモネラ. *治療学*. 34 : 17-21. 2000.
- 4) 伊豫田淳, 渡辺治雄. 志賀毒素産生性大腸菌. *治療学*. 34 : 27-32. 2000.
- 5) 寺嶋淳, 渡辺治雄. 赤痢. *治療学*. 34 : 35. 2000.
- 6) 岩本愛吉, 渡辺治雄, 相楽裕子, 増田剛太. 食中毒をめぐる. *治療学*. 35 ; 77-94. 2000.
- 7) 泉谷秀昌, 渡辺治雄. 腸管出血性大腸菌 O157 研究の最前線. *実験医学*. 18 : 1539-1544. 2000.
- 8) 渡辺治雄, 小坂健, 佐藤静夫. サルモネラ, ここが知りたい. *飼料*. 63 : 2-18.2000.
- 9) 廣瀬健二, 渡辺治雄. 細菌性食中毒検査法の進歩. *臨床と微生物*. 27:479-484. 2000.
- 10) 渡辺治雄. 腸管出血性大腸菌 O157 の科学 : 環境衛生管理技術大系. 第2 任有害微生物管理技術. 第1 巻, p.87-90. 2000
- 11) 森野吉晴, 山下晃司, 金澤祐子, 上野美加, 太田祐元, 北口三知世, 岩崎恵子, 辻澤恵都子, 旅田一衛, 牛生レバー喫食後の腸管出血性大腸菌 O157 感染事例の続発 - 和歌山市, 病原微生物検出情報, 21:164-165(2000).
- 12) 勢戸和子, 田口真澄, 河原隆二, 小林一寛 : ガールスカウト夏期キャンプにおける腸管出血性大腸菌 O157:H7 の集団発生事例, 病原微生物検出情報, 21:271-272(2000).
- 13) 中山 宏, 川端与志子, 石橋邦博, 堀川和美, 免疫磁気ビーズ法を用いた人便からの腸管出血性大腸菌 O157 検査における増菌培養の検討, *感染症学雑誌*, 74(6), 527-535. 2000.
- 14) 堀川和美, 環境と生命, 常盤 寛 編集, 青山社. pp147-173.2000.
- 15) 三戸部治郎, 渡辺治雄. 劇症を示す *Vibrio vulnificus* 感染症. *HACCP*:7:102-108.2001
- 16) 伊豫田淳, 渡辺治雄. 腸管出血性大腸菌 O157 のゲノム解析. *実験医学*. 19:469.2001
- 17) 渡辺治雄. 城宏輔. 細菌性食中毒. *Medical Tribune*. 6 月 4 日版 . p.57-59. 2001 年
- 18) 泉谷秀昌, 渡辺治雄. 食中毒菌のファージ型による疫学調査. *HACCP*.7:50-53.2001.
- 19) 中矢秀雄, 安原昭博, 吉村健, 忍穂井幸夫, 泉谷秀昌, 渡辺治雄. 乳児下痢症の便から検出したフルオロキノロン耐性 *Salmonella enterica* serotype

- Typhimurium definitive phage type12. 感染症学雑誌. 75 : 815-818. 2001
- 20) 渡辺治雄. 下痢原性細菌の最近の薬剤耐性の傾向. Infection & Technology. No.2. p.16. 2001
- 21) 寺嶋淳, 泉谷秀昌, 渡辺治雄. Pulse-Net-Japan の構築について. HACCP. 7:38-42. 2001.
- 22) 石川和彦, 林 賢一, 梅原成子, 山田和枝, 杉山信子, 児玉弘美, 橋本信代, 安田和彦: ビーフ角切りステーキを原因食とした散在的集団食中毒事例, 病原微生物検出情報, 22:166-167(2001)
- 23) 大中隆史, 横田正春, 石津真理子, 山内昌弘, 中村武, 田中智之, 山北太郎, 木口雅行, 岡澤昭子; 生レバーが原因食品と考えられる腸管出血性大腸菌 O157 による食中毒事例—堺市, 病原微生物情報, 22:291-292(2001).
- 24) 田中 博ほか: イカ菓子食中毒事件に関与した S. Oranienburg と S. Chester によるサルモネラ感染症の細菌学的検討. 食品微生物学会雑誌 Vol.18. 135-140 2001
- 25) 田中 博ほか: 寿司店を感染源とした赤痢の集団発生事例. 病原微生物検出情報 Vol.22. 35 2001
- 26) 寺嶋 淳, 泉谷秀昌, 渡辺治雄. パルスネット - 疫学調査と DNA 解析 - 日本臨床 60, 1070-1076, 2002
- 27) 寺嶋 淳, 泉谷秀昌, 渡辺治雄. Pulse Net Japan の構築について 月刊 HACCP
- 28) 寺嶋 淳, 泉谷秀昌, 渡辺治雄. パルスフィールドゲル電気泳動法による食中毒菌の分子疫学的解析. 食肉の科学, 43, 9-17, 2002.
- 29) 小林一寛, 勢戸和子, 八柳潤, 斉藤志保子, 寺尾通徳, 金子通治, 芹川俊彦, 倉本早苗, 藤沢倫彦, 鈴木理恵子, 山崎貢, 林賢一, 松根渉, 安岡富久, 堀川和美, 村上光一, 河野喜美子, 山田亨, 伊藤健一郎, 下痢原性大腸菌における付着因子保有状況とそれに基づく大腸菌検査法の一考察, 感染症学雑誌. 76(11), 911-920. 2002.
- 30) 堀川和美, 八柳潤, 内村真佐子, 齋藤眞, 小林一寛, 田中博, 森良一, 牛挽肉, ポテトサラダおよび野菜のドレッシング和えからの腸管出血性大腸菌 O157 の検出における培養法, 免疫磁気ビーズ, イムノク
- ロマト系簡易キットの有用性の検討, 日本食品微生物学会雑誌.19(4), 187-194. 2002.
- 31) 渡辺治雄. 細菌性腸管感染症. 化学療法の領域. 18 : 34-41. 2002.
- 32) 松本慶蔵, 渡辺治雄, 中山 昇. 感染症成立の新しい考え方. (対談). 化学療法の領域. 18 : 19-25. 2002.
- 33) 渡辺治雄. 食物, 水系感染症. Medical Technology. 30:301-302.2002.
17. 野本明男, 渡辺治雄, 岩本愛吉. 微生物ゲノムと病原性. 現代医療. 34 : 984-999. 2002.
- 34) 渡辺治雄, 寺嶋淳, 泉谷秀昌, 伊豫田淳, 三戸部治郎. 細菌のゲノム配列の多様性を利用した分子疫学的解析—パルスネットの構築. 現代医療 : 34 : 1011-1017. 2002.
- 35) 渡辺治雄. 下痢原性大腸菌群. 小児科学, 第2班. 監修; 白木和夫等. 医学書院. 2002年.
- 36) 田中博, 谷尾進司, 保科健, 富田正章, 中島洋, 榊美代子, 河本秀一, 清水俊夫, 砂原千寿子, 安岡富久, 井上博雄, 渡辺治雄. 中・四国地区における腸管出血性大腸菌感染症の疫学的解析と分離菌株の細菌学的検討. 感染症学雑誌. 76 : 439-449. 2002
- 37) 渡辺治雄, 寺嶋淳, 泉谷秀昌. パルスネットの構築; 細菌の DNA 解析に基づいた分子疫学的ネットワークシステム. 食品衛生研究 52 : 7-13. 2002
- 38) 松井珠乃, 鈴木理和, 柴田和顕, 木島秀雄, 瀬尾幸嗣, 塚田真樹, 松崎利奈子, 泉谷秀昌, 渡辺治雄, 大山卓昭, 岡部信彦, 高橋央. 市内一円で発生した Salmonella Enteritidis 食中毒の集団発生事例—豊橋, 2001年. 食品衛生研究 : 52 : 29-32. 2002.
- 39) 渡辺治雄, 寺嶋淳, 泉谷秀昌, 伊豫田淳, 田村和満. 分子疫学的手法に基づいた食中毒の監視体制: パルスネットの構築. 感染症学雑誌. 76 : 842-848. 2002
- 40) 渡辺治雄. 腸管出血性大腸菌感染症の最近の動向. Medical Tribune. p.44-45. 2002.
- 41) 北野通大, 田口寛, 浅井紀夫, 藤原恵子, 降井佐太郎, 前田知穂: 保育園で発生した腸管出血性大腸菌 O26 の集団感染事例—京都府, 病原微生物検出情報, 23:16-17(2002).
- 42) 姫路市環境衛生研究所, 姫路市保健所衛生課・予防課: 老人保健施設における腸管出血性大腸菌 O157 集団感染事例, 病原微生物検出情報, 23 : 319-320 (2002)
- 43) 山内昌弘, 石津真理子, 横田正春, 大中

隆史、田中智之：保育園における腸管出血性大腸菌 O26:H11 の集団発生事例—堺市、病原微生物検出情報、23:321-322(2002).

44) 田中 博ほか：病院で発生した腸管出血性大腸菌 O157 による集団感染事例
病原微生物検出情報 Vol. 23 .15 2002

研究課題名:「パルスフィールドゲル電気泳動法(Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE)の標準化及び画像診断を基盤とした分散型システムの有効性に関する研究」

分担研究総合報告書

分担研究者 寺嶋 淳 国立感染症研究所 細菌第一部
協力研究者 泉谷秀昌 国立感染症研究所 細菌第一部

研究要旨 PFGE による解析方法の標準化を行うために、統一した PFGE 方法の提示を行った。感染研に送付された腸管出血性大腸菌(EHEC)及び赤痢菌等の分離株を用いて PFGE を上記の条件に基づいて行い、PFGE 解析ソフトによる解析及びデータベースの構築を行った。同一施設における解析結果の蓄積においては上記の条件で支障なくデータベースが構築可能であり、平成 14 年度まで解析を継続中である。感染研で構築したデータベースの一部について、これらの結果を PDF の書類として、厚生労働行政総合情報システム(WISH)上の個別システム「PulseNet Japan」でほぼ 1ヶ月おきにデータを更新しながら公開するシステムを構築した。データベース構築の過程において、平成 14 年度までに EHEC や赤痢菌による diffuse outbreak の探知に PFGE 解析が有効であることが示された。

A. 研究目的

画像診断を基盤としたシステムの有効性を維持することを目的として、PFGE 解析条件の標準化を継続しデータベースを構築するために解析ソフトを利用した。これらの解析結果を含めてより新しい情報を関連機関において共有するために、厚生労働行政総合情報システム(WISH)上の個別システム「PulseNet Japan」を構築した。情報の正確な伝達を行うために、画像伝送時の条件等について検討した。

B. 研究方法

感染研に送付された株については平成 12 年度に設定した PFGE 条件を用いて解析を行った。PFGE の解析結果は、GelComparII (Applied Math 社)の日本語試行版(Fingerprinting II)を用いて画像解

析を行った。Fingerprinting II によるデンドログラム作成を行い、EHEC、赤痢菌等のデータベースを構築した。感染研で得られた結果(PFGE の画像)の一部については、本研究班構成機関に Internet 経由で電送し各地での PFGE 解析結果との比較のための参考資料とした。また、解析結果をほぼ 1ヶ月おきに WISH 上の個別システムである「PulseNet Japan」で公開し、疫学調査等のための還元資料とした。広域食中毒事例などへの迅速な対応が必要であると考えられる場合には、本研究班の構成機関を各基点として Internet 経由の画像配信等に関する条件検討も行った。本研究班構成機関に対して標準株を送付し、各機関で行った PFGE 画像を電送してもらい感染研においてデンドログラム作成を行った。

C. 研究結果と考察

1. PFGE の標準化およびデータベースの作成

平成12年度の分担研究においてPFGEの泳動条件の検討を行い、標準化したPFGE条件でその後の解析を行った。平成13年に感染研に送付されたEHECの総数は3452株で平成13年に分離されたEHEC O157は2438株あった。さらにEHEC O157 2438株中PFGE解析結果で同一パターンと考えられる分離株が534株(21.9%)検出され、これらの株が分離された地域は北海道と東北地方の一部を除くほとんどの都府県が含まれていた(図1)。平成14年においても下記のようにdiffuse outbreakが発生した。まず、4月下旬から5月にかけて近畿地方6府県の焼肉チェーン店においてdiffuse outbreakが発生した(図2)。感染研のデータベースにはこれらの発生以前に同一の遺伝子型であると思われるO157が平成13年12月末から14年1月初めの散发事例から分離されていたことを示す情報が存在した。2自治体からの送付株は同一遺伝子型であったが事例数が少なく疫学的な調査結果も不明で、両者の関連を即座に立証するには至らなかった。EHECO157の遺伝子型に多様性が存在することが明らかになっていなかで、複数の地域から同一遺伝子型の菌株が分離された場合に関連性を疑うべきとする今までの経験を強く支持する結果となった。データベース構築にあたり菌株に付随する疫学的情報が極めて重要であることを示唆する事例であった。平成13年にEHECO157全体の約2割を占めていた同一遺伝子型の株が平成14年の5月以降も検出され、全国23自治体から90株が送付された(約5%)。平成13年にはこの遺伝子型に極めて類似した2種類の遺伝子型を示す株も分離されたが、平成14年にもこれらの類似2遺伝子型が分離さ

れていた。さらに平成14年にはこれらのうちのひとつの型を示す株により老人ホームでの集団発生があり、8名の死者がでた。この事例では食品の「香味あえ」から分離されたO157が患者等から分離された株の遺伝子型と同一であった。この遺伝子型を示す株は全国14自治体から71株が分離されていた(図3A)。EHECのその他の血清型でO26、O111等による集団発生も例年のごとく報告され、O26では複数の小学校において同一遺伝子型の分離株による大規模な集団発生があった(図3B)。

EHEC以外の菌種については、平成12年末から発生した輸入牡蠣関連の赤痢の事例において321株の赤痢菌についてPFGEの解析を行い、輸入牡蠣から分離された赤痢菌の示すPFGEパターンと一致する分離株が日本各地の41自治体で分離されていることが明らかになった(図4, 5, 6)。2002年の5月以降に分離された*S. sonnei*の遺伝子型を調べる目的で、研究班6ブロックで分離された株の一部について韓国株との比較を行った。2001年末に分離されカキとの関連がある株や東南アジアからの帰国者から分離された株、韓国での流行株等が近似度95%以上のクラスターを形成したが、2002年後半に分離された株では、カキ関連株と同一遺伝子型を示す株は見つからなかった(図7)。したがって、少なくとも調べた株についてはカキ関連株とは異なる遺伝子型であり、2001年末からの同一遺伝子型の*S. sonnei*が一時的に広域から分離されていたことを支持する結果と考えられた。

2. 「PulseNet Japan」の構築とPFGE解析結果の配信

各機関におけるPFGE解析結果を直接入力してデータベースを構築してゆくことが目標であるが、

正確なデータベースを構築するためには異なる機関における解析結果では精度が十分であるとは言えず、現実的には感染研での解析結果をデータベースとして構築している。このデータベースに基づき、発生する事例に対応するために、下記の方法による 2 本立てのネットワーク運営を行って来た。すなわち、広域での発生が疑われた事例等については、感染研で得られた結果(PFGE の画像)の一部について本研究班構成機関に Internet 経由で電送し、各地での PFGE 解析結果との比較のための参考資料とした。また、解析結果をほぼ 1 ヶ月おきに WISH 上の個別システムである「PulseNet Japan」で公開し、疫学調査等のための還元資料とした(図 8-13)。このシステムの問題点として、下記の諸点についての改善が将来的には必要であると考えられたが、現実的には同時に記した対応策も可能であろう。

A) 同一施設内における実験結果であっても解析ソフトを利用した結果(デンドログラム)では、実際には 100%一致している泳動像でも近似度 100%にならない場合があり、解析ソフト利用における限界であると考えられた。したがって、デンドログラムの図による公開では、泳動像の目視による評価とデンドログラムによる結果の食い違いが生ずる恐れがある。広域流行と考えられる株の画像情報等については、Internet 経由の配信を行い、画像解析による誤差等から生ずる判断の揺るぎを最小限にとどめる工夫を行うべきであろう。

b) PFGE 解析結果とともに公開している疫学情報等の安全性を高めるために、関係機関内の閉鎖ネットワークである WISH を利用しているが、コンピュータ端末の数が少ないなど情報を入手する際の利用し易さにやや問題があると考えられた。情報へのアクセスの容易さもネットワークの利用

度を向上させる重要な要素であるから、Internet 利用による情報の公開の可能性についても検討すべきであると考えられる。個人のプライバシーに抵触する情報は無いことを考えると、ID やパスワードの設定によって安全性を確保し感染研のホームページ上に公開するののも一つの手段かもしれない。

D. 結論

データベースとの照合により広域流行株の探知が可能であることが確認されたが、複数機関からのデータ入力を可能にするためには継続的な精度管理が必要であり PFGE の技術的な標準化を今後も維持してゆくべきであると考えられた。また、解析ソフトの日本語完成版である FingerprintingII を効率良く利用するためにも統一したプロトコールの作成など今後ネットワーク内の連携を強める努力が求められる。さらに、情報の共有化の一環として、より容易なアクセスが可能である Internet 利用による情報公開も検討すべきと考えられた。

参考文献

1. Terajima, J., Izumiya, H., Iyoda, S., Tamura, K., Watanabe, H. High genomic diversity of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* isolates in Japan and its applicability for the detection of diffuse outbreak. *Jpn. J. Infect.* 55, 19-22, 2002.
2. Iguchi, A., Osawa, R., Kawano, J., Shimizu, A., Terajima, J., and Watanabe, H. Effects of lysogeny of Shiga toxin 2-encoding bacteriophages on pulsed-field gel electrophoresis fragment pattern of *Escherichia coli* K-12. *Current Microbiology*, 46(3):224-7, 2003.

3. Ohnishi, M., Terajima, J., Kurokawa, K., Nakayama, K., Murata, T., Tamura, K., Ogura, Y., Watanabe, H., and Hayashi, T. Genomic diversity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 revealed by whole genome PCR scanning. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99(26): 17043–17048, 2002.
4. Iguchi, A., Osawa, R., Kawano, J., Shimizu, A., Terajima, J., and Watanabe, H. Effects of repeated subculturing and prolonged room temperature storage of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 on pulsed-field gel electrophoresis. Journal of Clinical Microbiology 40(8): 3079–3081, 2002.
5. Yamaguchi T., Yokota Y., Terajima J., Hayashi T., Aepfelbacher M., Ohara M., Komatsuzawa H., Watanabe H., Sugai M. Clonal association of *Staphylococcus aureus* causing bullous impetigo and the emergence of new methicillin-resistant clonal groups in Kansai district in Japan. Journal of Infectious Diseases, 185, 1511–6, 2002.
6. Terajima, J., Izumiya, H., Iyoda, S., Tamura, K., Watanabe, H. Detection of a multi-prefectural *E. coli* O157:H7 outbreak caused by contaminated Ikura-Sushi ingestion. Jpn. J. Infect. Dis. 52, 52–3; J. Terajima, H. Izumiya, S. Iyoda, K. Tamura, H. Watanabe.
7. Terajima J, Izumiya H, Wada A, Tamura K, Watanabe H. Molecular epidemiological investigation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* isolates in Japan. J Appl Microbiol. 88:99S–105S. 2000.
8. 寺嶋 淳、泉谷秀昌、渡辺治雄 パルスネット - 疫学調査と DNA 解析 - 日本臨床 60, 1070–1076, 2002
9. 寺嶋 淳、泉谷秀昌、渡辺治雄 Pulse Net Japan の構築について 月刊 HACCP 2001 12. 64 - 68
10. 寺嶋 淳、泉谷秀昌、渡辺治雄 パルスフィールドゲル電気泳動法による食中毒菌の分子疫学的解析。食肉の科学、43, 9–17, 2002.